

11 Rec'd PCT/PTO

13 OCT 1989

PCT/JP89/00337
30.03.89

D.W.
5-8-90
#6
PCT
Art

日 本 国 特 許
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類は下記の出願書類の謄本に相違ないことを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 1988 年 3 月 31 日

出 願 番 号
Application Number: 昭和 63 年特許願第 80842 号

出 願 人
Applicant(s): 松下電器産業株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1989 年 6 月 23 日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

吉田文毅



出証平 1-95398

G01N 27/30

63-80842

(14,000円)

特 許 原 頁 (82)

昭和 63年 3月 31日

特 許 庁 長 官 殿

1 発 明 の 名 称

バイオセンサ及びその製造方法

2 請求項の数 7

3 発 明 者

住 所 大阪府門真市大字門真1006番地

松下電器産業株式会社内

氏 名 河 栗 真 里 子

(ほか3名)

4 特 許 出 願 人

住 所 大阪府門真市大字門真1006番地

名 称 (582) 松下電器産業株式会社

代 表 者 谷 井 昭 雄

5 代 理 人 〒571

住 所 大阪府門真市大字門真1006番地

松下電器産業株式会社内

氏 名 (5971) 井理士 中 尾 敏 男

(ほか1名)

[連絡先 電話(東京)437-1121 東京法務分室]

6 添付書類の目録

- | | |
|-------------|-----|
| (1) 明 細 書 | 1 通 |
| (2) 図 面 | 1 通 |
| (3) 委 任 状 | 1 通 |
| (4) 願 書 副 本 | 1 通 |
| (5) 優先権主張書 | 1 通 |

7 前記以外の発明者および代理人

(1) 発明者

住 所	大阪府門真市大字門真1006番地
氏 名	松下電器産業株式会社内 藤 田 真 由 美

住 所	同 所
氏 名	南 海 史 朗

住 所	同 所
氏 名	飯 島 孝 志

(2) 代理人

住 所	大阪府門真市大字門真1006番地
氏 名	松下電器産業株式会社内 (6152) 弁理士 粟 野 重 孝

1、 発明の名称

バイオセンサ及びその製造方法

2、 特許請求の範囲

(1) 少なくとも測定極と対極からなる電極系を設けた絶縁性の基板を備え、前記電極系の表面に酸化還元酵素と親水性高分子からなる酵素層を設け、その上部に電子受容体層を形成し、前記酵素と電子受容体と試料液の反応に際しての物質濃度変化を電気化学的に前記電極系で検知し前記基質濃度を測定することを特徴とするバイオセンサ。

(2) 少なくとも測定極と対極からなる電極系を設けた絶縁性の基板を備え、前記電極系の表面に酸化還元酵素と親水性高分子からなる酵素層を設け、その上部に界面活性剤を含有した電子受容体層を形成し、前記酵素と電子受容体と試料液の反応に際しての物質濃度変化を電気化学的に前記電極系で検知し前記基質濃度を測定することを特徴とするバイオセンサ。

(3) 電極系が、絶縁性の基板上にスクリーン印

刷で形成されたカーボンを主体とする材料からなる請求項 1 または 2 に記載のバイオセンサ。

(4) 親水性高分子が、デンプン系、カルボキシメチルセルロース系、ゼラチン系、アクリル酸塩系、ビニルアルコール系、ビニルピロリドン系、無水マレイン酸系から選択された一つの系の物質もしくは二種以上の系の混合物である請求項 1 または 2 に記載のバイオセンサ。

(5) 電子受容体層が、粒径が $100\mu\text{m}$ 以下の電子受容体の微粒子からなる請求項 1 または 2 に記載のバイオセンサ。

(6) 絶縁性の基板上に電極系を作製し、前記電極上に、親水性高分子および酸化還元酵素を塗布し、乾燥して酵素層を形成後、電子受容体と有機溶媒の混合物を前記酵素層の上に展開し有機溶媒を除去して電子受容体層を形成させるバイオセンサの製造方法。

(7) 絶縁性の基板上に電極系を作製し、前記電極上に、親水性高分子および酸化還元酵素を塗布し、乾燥して酵素層を形成後、電子受容体と界面活性

剤と有機溶媒の混合物を前記酵素層の上に展開し有機溶媒を除去して電子受容体層を形成させるバイオセンサの製造方法。

3. 発明の詳細な説明

産業上利用分野

本発明は、種々の微量の生体試料中の特定成分について、試料液を希釈することなく迅速かつ簡便に定量することのできるバイオセンサおよびその製造方法に関する。

従来技術

従来、血液などの生体試料中の特定成分について、試料液の希釈や攪拌などを行なうことなく簡易に定量しうる方式として、特開昭 61-294351号公報に記載のバイオセンサを提案した（第4図）。このバイオセンサは、絶縁性の基板1上にスクリーン印刷等の方法でカーボンなどからなる電極系2, 3, 4を形成し、この上を酸化還元酵素と電子受容体を担持した多孔体9で覆い保持枠8とカバー10で全体を一体化したものである。試料液を多孔体上へ滴下すると、多孔体に担持されてい

る酸化還元酵素と電子受容体が試料液に溶解し、試料液中の基質との間で酵素反応が進行し電子受容体が還元される。反応終了後、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を求める。

発明が解決しようとする課題

このような従来の構成では、電極系を含む基板面の濡れが必ずしも一様とならないため、多孔体と基板との間に気泡が残り応答電流に影響を与えたり、反応速度が低下した。また、電極に吸着し易い物質が試料液中にあると、応答が低下した。

課題を解決するための手段

本発明は上記課題を解決するために、絶縁性の基板上に少なくとも測定極と対極からなる電極系を設け、酵素と電子受容体と試料液の反応に際しての物質濃度変化を電気化学的に前記電極系で検知し、試料液中の基質濃度を測定するバイオセンサにおいて、前記電極系の表面に酸化還元酵素と親水性高分子からなる酵素層を設け、その上部に電子受容体層を形成したものである。

作用

本発明によれば、電極系をも含めたディスプレイタイプのバイオセンサを構成することができ、試料液をセンサに添加することにより、極めて容易に基質濃度を測定することができる。しかも、電極系の表面に直接、酵素層及び電子受容体層を形成することにより、独立した２層が接近して容易に形成されるため小型化が可能となり、反応も迅速に行なわれ、さらに、酵素層の親水性高分子により試料中の固形成分や蛋白質が電極表面に吸着するのを防ぎ、電極表面のぬれ性を向上して精度の良い測定が可能となった。

また、電子受容体層の作製に有機溶媒を用いることにより早く薄い層ができ、さらに、界面活性剤を加えることにより、有機溶媒にうまく電子受容体を分散させ、製造を簡易にし、より強固な層が形成できた。

実施例

以下、本発明の一実施例について説明する。

(実施例 1)

バイオセンサの一例として、グルコースセンサ

について説明する。第1図は、グルコースセンサの一実施例について示したもので、構成部分の分解図である。ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1に、スクリーン印刷により導電性カーボンペーストを印刷し、加熱乾燥することにより、対極2、測定極3、参照極4からなる電極系を形成する。次に電極系を部分的に覆い、各々の電極の電気化学的に作用する部分となる2'、3'、4'（各1mm²）を残すように、絶縁性ペーストを前記と同様に印刷し、加熱処理をして絶縁層5を形成する。この電極系（2'、3'、4'）の表面を覆うようにセルロース系の親水性高分子の一種であるCMC（カルボキシメチルセルロース）の水溶液を塗布し、45℃で30分乾燥した。得られたCMC層の上に酸化還元酵素としてグルコースオキシダーゼ（GOD）をpH5.6のリン酸緩衝液に溶解したものを塗布した後、室温で乾燥し、酵素層であるCMC-GOD層6を得た。この操作により、CMC層が一部溶解してGODと混合した状態のCMC-GOD層が形成された。

その上に有機溶媒としてトルエンに電子受容体であるフェリシアン化カリウムの微結晶を混ぜたものを滴下し、室温で放置してトルエンを気化させることによりフェリシアン化カリウム層を形成した。フェリシアン化カリウムの水溶液をGOD-CMC層に滴下して乾燥してもフェリシアン化カリウムの層は形成される。しかし、GODを塗布しているため、高温の乾燥ができず、乾燥に時間がかかりフェリシアン化カリウムの結晶が大きくなり溶解速度が遅いため反応速度が遅くなった。

上記に用いたフェリシアン化カリウム微結晶の粒径については、市販のフェリシアン化カリウムの結晶を粉碎し、ふるいにより所定の粒径のものを集めてフェリシアン化カリウム層を形成し、各種の粒径のもので作成したセンサについて応答を比較した。第3図は、横軸にふるいのメッシュの大きさ、縦軸にグルコース400mg/dlに対する反応終了時間を示した。()の中は穴の径(μm)を表わしている。第3図に示すように細かい粒径の方が速やかに溶解反応終了に必要な時

間が短かった。145メッシュ（日本工業規格）を通過したフェリシアン化カリウム（粒径100 μ m以下）で作製したセンサは、2分以内に反応が終了した。さらに、フェリシアン化カリウム層を作製するとき粒径が小さい方が均一に膜ができ応答のばらつきが少なかった。フェリシアン化カリウムの微結晶は粉碎でも作製できるが、フェリシアン化カリウムの水溶液をエタノール中で再結晶させると簡易に10 μ m以下の粒径が作成でき、フェリシアン化カリウム層を形成させると密な膜となり、反応終了時間も1分30秒まで短縮できた。

100 μ m以下に微粒化したフェリシアン化カリウムをトルエンに混ぜて滴下すると、トルエンがすみやかに気化し、微粒子のままのフェリシアン化カリウム層が形成でき、溶解速度も速く迅速に測定できた。さらに、溶液状態のフェリシアン化カリウムとGODは反応して保存特性が悪くなる欠点があったが、有機溶媒をもちいることにより、GODが溶解せずに、フェリシアン化カリウムの

層が形成でき、G O D との反応が抑制できた。

上記のように構成したグルコースセンサに試料液としてグルコース標準液を $10\ \mu\text{l}$ 滴下し、2分後に参照極を基準にして測定極にアノード方向へ $+0.6\ \text{V}$ のパルス電圧を印加し5秒後の電流を測定する。グルコース標準液にフェリシアン化カリウムが溶解し、これがCMC-G O D 層に達してグルコースが酸化され、このときフェリシアン化カリウムがフェロシアン化カリウムに還元される。そこで、上記のパルス電圧の印加により、生成したフェロシアン化カリウムの濃度に基づく酸化電流が得られ、この電流値は基質であるグルコースの濃度に対応する。グルコースの標準液を滴下し応答電流を測定したところ $500\ \text{mg/dl}$ という高濃度まで良好な直線性が得られた。

上記のグルコースセンサに血液サンプルを $10\ \mu\text{l}$ 滴下して2分後の応答電流を測定すると、非常に再現性のよい応答が得られた。フェリシアン化カリウムを担持したバルブをCMC-G O D 層の上へ置くと、応答電流が低下し、反応終了まで

に5分以上要した。これは、フェリシアン化カリウムが試料液に溶けてCMC-GOD層に達する前に血球などが混入して反応を妨げていると考えられる。しかし、CMC-GOD層の上に直接フェリシアン化カリウム層を形成することで試料液がくると速やかに反応が始まって2分で終了した。CMC層があることにより、液が滴下されるとCMC層が膨潤し、電流がスムーズに流れた。GODを電極表面に直接塗ると電極表面に吸着され応答が低下するが、予めCMC層を設けることによりGODの吸着も防ぐことができた。GOD-CMC層とフェリシアン化カリウム層は、電極上に単に塗布するだけで作成でき、担持する材料や濾過膜などを必要としないためセンサを大量生産する際、非常にメリットがあると考えられる

(実施例2)

実施例1に示したようにしてCMC-GOD層を形成した後、フェリシアン化カリウム層を形成する際トルエンに界面活性剤としてレシチン（ホスファチジルコリン）を溶解して1wt%溶液を

調製し、これにフェリシアン化カリウムの微結晶を混ぜたものを用いてフェリシアン化カリウムとレシチンの層を形成した。レシチンの濃度が0.01 wt %以上になるとフェリシアン化カリウムがうまくトルエン中で分散したため滴下が容易となり、3 μ l の微量な液でも薄膜状のフェリシアン化カリウム-レシチン層が形成できた。レシチンがない場合は、フェリシアン化カリウム層が不均一に形成されたり基板をまげるとはがれるという欠点が見られたが、レシチンを添加することにより均一ではがれにくいフェリシアン化カリウム層が容易に形成できた。レシチンの濃度が高くなるとともに、フェリシアン化カリウム層がはがれにくくなるが、フェリシアン化カリウムの溶解速度も落ちるため、0.01-3 wt %が適当と考えられる。上記センサにグルコース標準液を滴下して実施例 1 と同様にして応答を測定したところ、グルコース濃度 500 mg/dl まで直線性が得られた。さらに、血液を滴下したところ、レシチン層によりすみやかにひろがり反応が始まったため、6 μ l という微量

のサンプルでも再現性のよい応答が得られた。レシチンのかわりにポリエチレングリコールアルキルフェニルエーテル（商品名：トリトンX）を用いたところ、フェリシアン化カリウムの微粒子をトルエン中に分散させるためには 0.1%以上必要であったが、レシチンと同様に良好なフェリシアン化カリウム層が形成できた。界面活性剤としては、前記の例の他に、オレイン酸やポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステルやシクロデキストリンなど、電子受容体を有機溶媒に分散させ、かつ酵素活性に影響をおよぼさないものであれば、特に制限されることはない。

親水性高分子としてCMCの他にもゼラチンやメチルセルロースなども使用でき、でんぶん系、カルボキシメチルセルロース系、ゼラチン系、アクリル酸塩系、ビニルアルコール系、ビニルピロリドン系、無水マレイン酸系のものが好ましい。これらの高分子は容易に水溶液とすることができるので、適当な濃度の水溶液を塗布、乾燥することにより、必要な厚さの薄膜を電極上に形成する

ことができる。

電子受容体を混合する有機溶媒としては、トルエンや石油エーテルなど、GOD活性および印刷電極への影響の少ないものであればよい。

電極系を形成する方法としてのスクリーン印刷は、均一な特性を有するディスプレイタイプのバイオセンサを安価に製造することができ、特に、価格が安く、しかも安定した電極材料であるカーボンを用いて電極を形成するのに好都合な方法である。上記実施例においては電極系として3電極方式の場合について述べたが、対極と測定極からなる2電極方式でも測定は可能である。

なお、本発明のバイオセンサは上記実施例に示したグルコースセンサに限らず、アルコールセンサやコレステロールセンサなど、酸化還元酵素の関与する系に用いることができる。酸化還元酵素として実施例ではグルコースオキシダーゼを用いたが、他の酵素、たとえばアルコールオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、等を用いることができる。また、電

子受容体として、上記実施例に用いたフェリシア
ン化カリウムが安定に反応するので適しているが
P-ベンゾキノンを使えば、反応速度が大きいので
高速化に適している。また、2,6-ジクロロ
フェノールインドフェノール、メチレンブルー、
フェナジンメトサルフェート、 β -ナフトキノン
4-スルホン酸カリウム、フェロセン等が使用で
きる

発明の効果

このように本発明のバイオセンサは、絶縁性の
基板上に電極系を印刷し、酸化還元酵素と親水性
高分子からなる酵素層と電子受容体層を形成する
ことにより、極めて容易に生体試料中の基質濃度
を測定することができ、試料中のタンパク質など
の妨害物質が電極表面に吸着するのを親水性高分
子で防ぎ、測定精度を向上させたものである。さ
らに、本発明の製造方法は、酸化還元酵素と電子
受容体を独立させながら担持して近接できるため
速やかに反応ができ迅速な測定を可能にした。ま
た、電子受容体層を形成するとき界面活性剤を添

加することにより、微量の電子受容体を均一にか
つはがれにくい薄膜層に担持でき、保存性や大量
生産に大きな効果がある。

4. 図面の簡単な説明

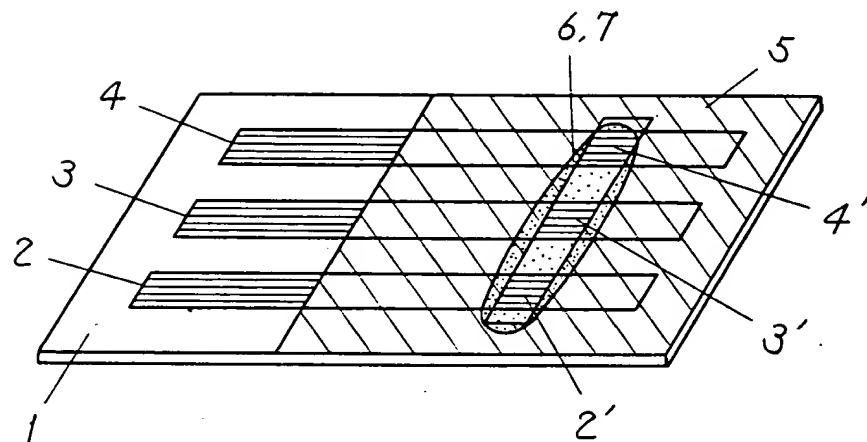
第1図は本発明の一実施例のバイオセンサの斜
視図、第2図は同バイオセンサの縦断面図、第3
図は同バイオセンサの応答特性図、第4図は従来
例のバイオセンサの斜視図である。

1・・・絶縁性基板、2・・・対極、3・・・
測定極、4・・・参照極、5・・・絶縁層、6・
・・CMC-GOD層、7・・・フェリシアン化
カリウム層、8・・・保持枠、9・・・多孔体、
10・・・カバー。

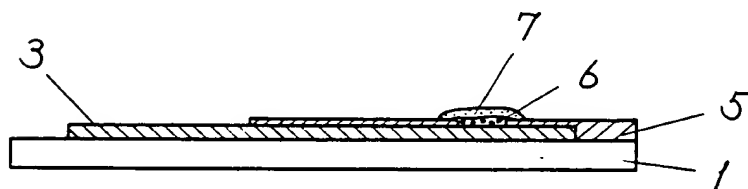
代理人の氏名 弁理士 中尾敏男 ほか1名

- 1 --- 絶縁性基板
- 2 --- 対極
- 3 --- 測定極
- 4 --- 参照極
- 5 --- 絶縁層
- 6 --- CMC-GDD層
- 7 --- フェリシアン化カリウム層

第 1 図



第 2 図

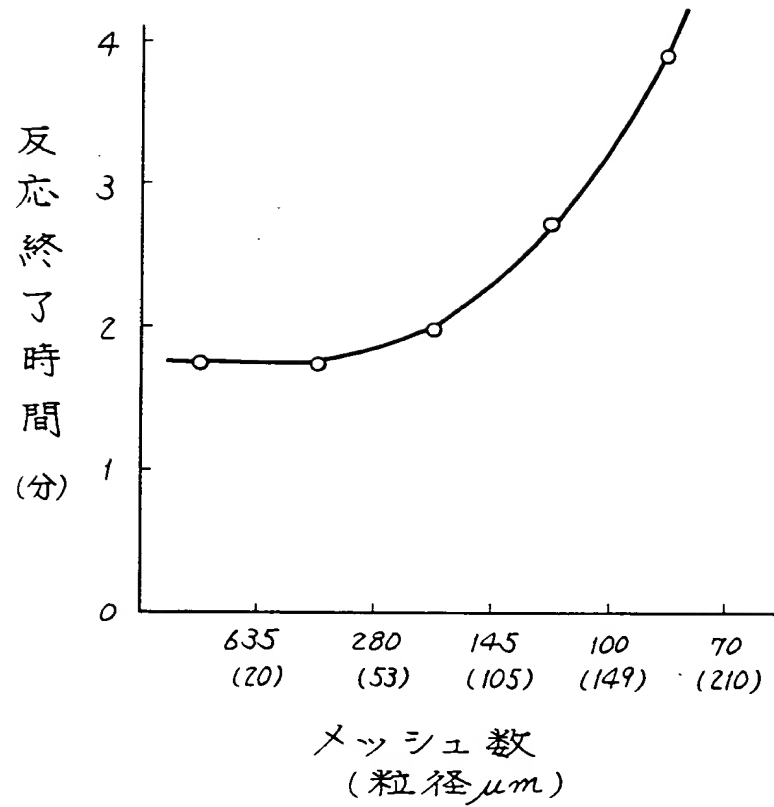


代理人の氏名

弁理士 中 尾 敏 男

ほか 1 名

第 3 図



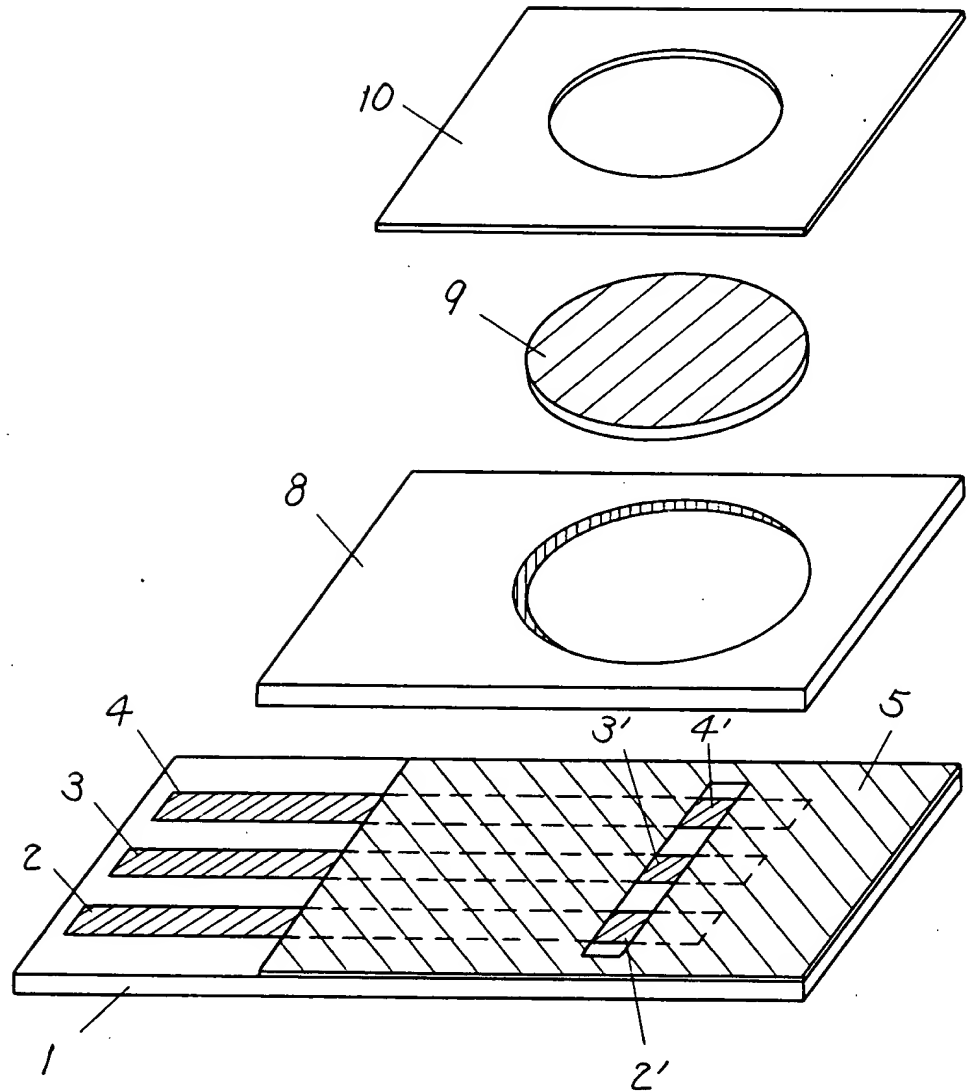
代理人の氏名

弁理士 中 尾 敏 男

ほか1名

- 1 --- 絶縁性の基板
- 2, 2' --- 対極
- 3, 3' --- 測定極
- 4, 4' --- 参照極
- 5 --- 絶縁層
- 8 --- 保持枠
- 9 --- 多孔体
- 10 --- カバー

第 4 図



代理人の氏名

弁理士 中 尾 敏 男

ほか 1 名

手続補正書

昭和 63 年 7 月 // 日

特許庁長官殿

1 事件の表示

昭和 63 年 特許願 第 80842 号

2 発明の名称

バイオセンサ及びその製造方法

3 補正をする者

事件との関係	特許出願人
住所	大阪府門真市大字門真1006番地
名称	(582) 松下電器産業株式会社
代表者	谷井昭雄

4 代理人 〒 571

住所	大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内
----	---------------------------------

氏名	(6152) 弁理士 栗野重孝 (ほか 1 名)
----	-----------------------------

〔連絡先 電話(東京)434-9471 東京特許分室〕

5 補正の対象

優先権主張書

6 補正の内容

優先権主張書を別紙の通り補正します。

優先権主張書

昭和63年 3月 31日

特許庁長官 殿

この特許出願に係る発明について特許法42条の2第1項の規定による優先権を主張します。

1 先の出願の表示

出願番号 昭和63年特許願第20946号

出願日 昭和63年1月29日

2 特許出願人

住 所 大阪府門真市大字門真1006番地

名 称 (582) 松下電器産業株式会社

代表者 谷 井 昭 雄

3 代理人

住 所 大阪府門真市大字門真1006番地

松下電器産業株式会社内

氏 名 (5971) 弁理士 中 尾 敏 男

(ほか1名)

[連絡先 電話(東京) 437-1121東京法務分室]

代理人変更届

昭和 63 年 9 月 8 日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

昭和 63 年 特 許 願 第 80842 号

2. 手続をした者

事件との関係 出 願 人

住 所 大阪府門真市大字門真1006番地
名 称 (582) 松下電器産業株式会社
代表者 谷 井 昭 雄

3. 届出の内容

選任した代理人

住 所 大阪府門真市大字門真1006番地
松下電器産業株式会社内
氏 名 (6152) 弁理士 栗 野 重 孝
住 所 大阪府門真市大字門真1006番地
松下電器産業株式会社内
氏 名 (7242) 弁理士 小 鍛 治 明

[連絡先 電話(東京)434-9471 東京特許分室]

解任した代理人

住 所 大阪府門真市大字門真1006番地
松下電器産業株式会社内
氏 名 (5971) 弁理士 中 尾 敏 男

4. 添付書類の目録

委 任 状

1 通

手続補正書

平成 元年 6 月 6 日

特許庁長官殿

1 事件の表示

昭和 63 年特許願第 80842 号

2 発明の名称

バイオセンサ及びその製造方法

3 補正をする者

事件との関係 特許出願人
住所 大阪府門真市大字門真1006番地
名称 (582) 松下電器産業株式会社
代表者 谷井昭雄

4 代理人 〒571

住所 大阪府門真市大字門真1006番地
松下電器産業株式会社内
氏名 (6152) 弁理士 栗野重孝

(ほか1名)

[連絡先 電話 (東京) 434-9471 東京特許分室]

5 補正の対象

願書

6 補正の内容

願書を別紙の通り補正します。

7、添付書類の目録

(1)	願 書	1 通
(2)	譲渡証	1 通
(3)	宣誓書	1 通
(4)	理由書	1 通
(5)	証明書	1 通